

## 明細書

# 新規アセトアセチルCoA還元酵素および光学活性アルコールの製造方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、有用な新規アセトアセチルCoA還元酵素に関する。また、本発明は、当該酵素又は既知のアセトアセチルCoA還元酵素を用いた、光学活性アルコール類、とりわけ(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリル、光学活性3-ヒドロキシブタン酸エステル及び光学活性1-フェニルエタノール誘導体の製造方法に関する。(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリル、光学活性3-ヒドロキシブタン酸エステル及び光学活性1-フェニルエタノール誘導体等の光学活性アルコールは、各種医薬品・農薬等の合成原料あるいは中間体として有用な化合物である。

### 背景技術

- [0002] 光学活性3-ヒドロキシペンタンニトリル、特に(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルは、種々の医薬品や農薬等の製造原料や合成中間体として非常に有用である。そのため、高光学純度の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルを高収率かつ工業的に実施可能な製造方法の開発が強く求められてきた。
- [0003] 従来、(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルの製造方法としては、ラセミ体3-アセトキシペンタンニトリルをシュードモナス・セパシア・リパーゼ(*Pseudomonas cepacia lipase*)を用いて不斉加水分解して、(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルと(S)-3-アセトキシペンタンニトリルに光学分割する方法が知られている(非特許文献1を参照)。この方法の場合、光学純度90%e. e. の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルが得られるが、酵素の使用量は基質の2分の1重量と多く、かつ収率も29%と低く、経済的な製造方法とはいえない。
- [0004] 更に、上記非特許文献1には、前記の不斉加水分解反応において、チオクラウンエーテル(1, 4, 8, 11-テトラチアシクロテトラデカン)を添加することにより、光学純度99%e. e. 以上の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルが収率49%で得られると記載されている。しかしながら、反応に必要なチオクラウンエーテルの量は基質の10分の1

重量と非常に多いため、コスト面及び安全面から工業的な実施には適していない。また、この非特許文献1の技術では、反応生成物である(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルと(S)-3-アセトキシペンタンニトリルの分離をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて行っているが、この分離法も繁雑であって実用的ではなく、工業的に採用するには有利な方法ではない。

- [0005] 上記のような状況下、本発明者らは3-ケトペンタンニトリルを酵素で不斉還元して光学活性3-ヒドロキシペンタンニトリルを製造する方法を発明し、先に出願した(特許文献1を参照)。この方法では、非常に簡便な方法で高光学純度(94.8%e. e.)の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルを得ることができるが、更に高い光学純度の目的物を得るためにには、改良の余地が残されていた。
- [0006] また、光学活性3-ヒドロキシブタン酸エステル、特に(R)-3-ヒドロキシブタン酸エステルも、種々の医薬品や農薬等の製造原料や合成中間体として非常に有用である。(R)-3-ヒドロキシブタン酸エステルの製造方法の一つに、アセト酢酸エステルを生体触媒で不斉還元して製造する方法がある。例えば、パン酵母を用いた方法(非特許文献2を参照)、ゲオトリカム・キャンディダム(*Geotrichum candidum*)やアスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)等の微生物を用いた方法(非特許文献3を参照)、ゲオトリカム・キャンディダム(*Geotrichum candidum*)由来のグリセロールデヒドロゲナーゼを用いた方法(非特許文献4を参照)等が知られている。しかしながら、これらの方法はいずれも、その基質仕込み濃度及び基質から生成物への転換率が実用上十分ではなく、より効率の良い合成法が待ち望まれていた。
- [0007] また、光学活性1-フェニルエタノール誘導体も、種々の医薬品や農薬等の製造原料や合成中間体として非常に有用である。
- 光学活性1-フェニルエタノール誘導体を酵素的不斉還元によって製造する方法としては、2-ハロー-1-(置換フェニル)エタノンに、アシビア(Ashbya)属やオガタエア(Ogataea)属等に属する微生物又はその処理物を作用させ、光学活性2-ハロー-1-(置換フェニル)エタノールを得る方法(特許文献2、3、4を参照)が開示されている。また、コリネバクテリウム・スピーシーズ(Corynebacterium sp.)ST-10由来のフェニルアセトアルデヒド還元酵素の遺伝子を導入した組換え大腸菌を用いる同様の方

法(非特許文献5を参照)が開示されている。しかしながら、これらの方はいずれも、その基質の仕込み濃度及び基質から生成物への転換率が低く、より効率のよい製造方法が望まれていた。

[0008] 一方、NADHもしくはNADPHを補酵素としてアセトアセチルCoAを還元する酵素(アセトアセチルCoA還元酵素)は、種々の微生物から単離され、その性質が報告されているが(非特許文献6、7を参照)、3-ケトペンタンニトリル、アセト酢酸エステルあるいは1-フェニルエタノン誘導体にアセトアセチルCoA還元酵素を作用させ、対応する光学活性アルコールを製造することは報告されていない。

[0009] 特許文献1:WO03/031636

特許文献2:WO92/01804

特許文献3:特開平11-215995

特許文献4:WO03/00911

非特許文献1:Journal of Organic Chemistry, 62, 9165(1997)

非特許文献2:Enzyme and Microbial Technology, 31, 656(2002)

非特許文献3:Journal of the Chemical Society, Chemical Communication, 7, 461(1984)

非特許文献4:Tetrahedron Lett., 29, 2453(1988)

非特許文献5:Eur. J. Biochem., 269, 2394(2002)

非特許文献6:FEMS Microbiol. Lett., 52, 259-264(1988)

非特許文献7:J. Microbiol. Biotechnol., 6, 425-431(1996)

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

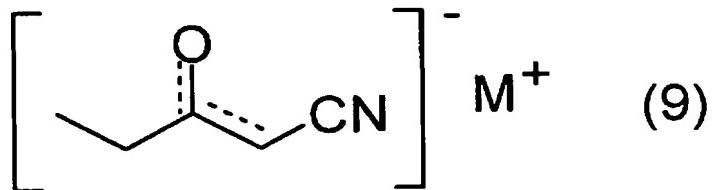
[0010] 本発明の目的は、光学活性アルコール、とりわけ(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルの製造に極めて有用な、新規アセトアセチルCoA還元酵素を提供することである。更に、本発明の目的は、光学活性アルコール、とりわけ(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリル、(R)-3-ヒドロキシブタン酸エステル及び光学活性1-フェニルエタノール誘導体の効率的な製造方法を提供することである。

### 課題を解決するための手段

- [0011] 本発明者らは鋭意検討の結果、意外にもアセトアセチルCoA還元酵素が、3-ケトペントンニトリル、アセト酢酸エステル、1-フェニルエタノン誘導体をそれぞれ不斉還元し、(R)-3-ヒドロキシペントンニトリル、(R)-3-ヒドロキシブタン酸エステル、光学活性1-フェニルエタノール誘導体を生成しうることを見出した。
- また、3-ケトペントンニトリルを不斉還元し、光学純度99%e. e. 以上の(R)-3-ヒドロキシペントンニトリルを生成する活性を有する今までに報告例のない新規アセトアセチルCoA還元酵素を見出し、単離することに成功した。更に、該酵素をコードするDNAを単離し、組換えベクター並びに該酵素を大量発現する形質転換体を創製することにも成功し、本発明を完成するに至った。
- [0012] すなわち、本発明は、NADPHもしくはNADHを補酵素として、3-ケトペントンニトリルに作用して、光学純度99%e. e. 以上の(R)-3-ヒドロキシペントンニトリルを生成する新規アセトアセチルCoA還元酵素に関する。また、本アセトアセチルCoA還元酵素をコードするDNA、該DNAを含有する組換えベクター、及び、上記アセトアセチルCoA還元酵素を高生産する形質転換体に関する。
- [0013] また、本発明は、該形質転換体を用いた、光学純度99%e. e. 以上の(R)-3-ヒドロキシペントンニトリルの実用的な製造方法に関する。
- また、本発明は、アセトアセチルCoA還元酵素を用いた、(R)-3-ヒドロキシペントンニトリル、(R)-3-ヒドロキシブタン酸エステル、光学活性1-フェニルエタノール誘導体といった有用な光学活性アルコールの実用的な製造方法に関する。
- [0014] 以下、詳細に本発明を説明する。
- 本発明におけるアセトアセチルCoA還元酵素とは、アセトアセチルCoAを還元する能力(アセトアセチルCoA還元活性)を有する全ての酵素を包含する。
- アセトアセチルCoA還元活性は、例えば、以下の方法により測定できる。
- 100mMリン酸緩衝液(pH6. 5)に、アセトアセチルCoA 0. 25mM、NADPHもしくはNADH 0. 25mM、及び酵素を含む反応液を、30°Cで反応させ、NADPHもしくはNADHの消費に伴う波長340nmの吸光度の減少により測定できる。
- [0015] また、本発明で使用する3-ケトペントンニトリルは、例えば、WO94/21617に記載の方法で合成可能である。また、3-ケトペントンニトリルとして、WO03/031636に

記載の方法で得られる下記式(9)：

[0016] [化1]

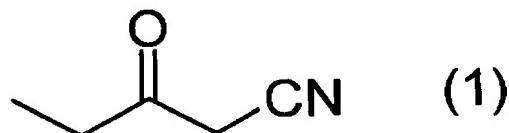


[0017] (式中、Mはアルカリ金属を示す)で表される3-ケトペンタンニトリルアルカリ金属塩、  
例えば3-ケトペンタンニトリルナトリウム塩等も使用し得る。

[0018] まず、本発明の一つである新規アセトアセチルCoA還元酵素について詳述する。  
本発明のアセトアセチルCoA還元酵素としては、以下の(1)及び(2)の理化学的性  
質を有するアセトアセチルCoA還元酵素が挙げられる。

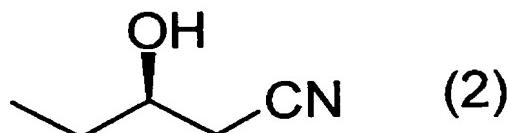
(1)作用:NADPHもしくはNADHを補酵素として、下記式(1)：

[0019] [化2]



[0020] で表される3-ケトペンタンニトリルに作用して、下記式(2)：

[0021] [化3]



[0022] で表される光学純度99%e. e. 以上の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルを生成する

、  
(2)分子量:ゲル滿過分析において約85500、SDSポリアクリルアミド電気泳動分析  
において約26000。

[0023] 上記光学純度、ゲル滿過分析による分子量及びSDSポリアクリルアミド電気泳動分

析による分子量の測定は、後述の実施例に記載のようにして行うことができる。

- [0024] 上記アセトアセチルCoA還元酵素は、更に、以下の(3)～(5)の理化学的性質を有することが好ましい。

(3)至適温度:27～33℃、

(4)至適pH:5. 5～6. 5、

(5)阻害剤:p—クロロメルクリ安息香酸、硫酸銅、硝酸銀、塩化水銀で阻害される。

- [0025] また、本発明のアセトアセチルCoA還元酵素としては、例えば、(a)配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は、(b)配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸が付加、欠失又は置換したアミノ酸配列からなり、3—ケトペンタンニトリルに作用して、光学純度99%e. e. 以上の(R)—3—ヒドロキシペンタンニトリルを生成する活性を有するポリペプチドを挙げることができる。

- [0026] 配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が付加、欠失又は置換したアミノ酸配列からなるポリペプチドは、Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley and Sons, Inc., 1989年)等に記載の公知の方法に準じて調製することが可能であり、3—ケトペンタンニトリルに作用して、光学純度99%e. e. 以上の(R)—3—ヒドロキシペンタンニトリルを生成する活性を有する限り、本発明のアセトアセチルCoA還元酵素に包含される。また、アミノ酸の変異は自然界において生じることもあり、人工的にアミノ酸を変異したポリペプチドのみならず、自然界においてアミノ酸が変異したポリペプチドについても、3—ケトペンタンニトリルに作用して、光学純度99%e. e. 以上の(R)—3—ヒドロキシペンタンニトリルを生成する活性を有する限り、本発明のアセトアセチルCoA還元酵素に包含される。

- [0027] ここで、「3—ケトペンタンニトリルに作用して、光学純度99%e. e. 以上の(R)—3—ヒドロキシペンタンニトリルを生成する活性」は、例えば、以下のような反応並びに測定条件によって確認することができる。

あらかじめ3—ケトペンタンニトリル5mg、NADPH50mg及び1Mリン酸緩衝液(pH6. 5)50 $\mu$ lを入れた試験管に、酵素溶液(あるいは無細胞抽出液)450 $\mu$ lを加えて、30℃で1晩振とうする。反応液を酢酸エチル1mlで抽出し、生成した3—ヒドロキシペ

ンタンニトリルの光学純度をキャピラリーガスクロマトグラフィーにより測定する。

[0028] [キャピラリーガスクロマトグラフィー分析条件]

カラム:Chiradex G-TA (20m×0.25mm) (ASTEC社製)、検出:FID

カラム温度:120°C

注入温度:200°C

検出温度:200°C

キャリアーガス:ヘリウム(100kPa)

スプリット比:100/1

溶出時間:(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリル 4.37分、(S)-3-ヒドロキシペンタンニトリル 5.17分。

[0029] 本発明のアセトアセチルCoA還元酵素は、3-ケトペンタンニトリルを(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルに変換する能力を有する微生物、動物又は植物から見いだすことができる。本発明のアセトアセチルCoA還元酵素の探索方法としては、例えば、WO 03/031636に記載の方法等が挙げられる。

[0030] 例えば、酵母からは以下のように探索すればよい。グルコース40g、酵母エキス3g、リン酸水素二アンモニウム6.5g、リン酸二水素カリウム1g、硫酸マグネシウム7水和物0.8g、硫酸亜鉛7水和物60mg、硫酸鉄7水和物90mg、硫酸銅5水和物5mg、硫酸マンガン4水和物10mg、塩化ナトリウム100mg(いずれも1L当たり)の組成からなる液体培地(pH7)5mlを、試験管に入れて殺菌後、無菌的に酵母を接種し、30°Cで2~3日間振とう培養する。その後、菌体を遠心分離により集め、グルコース2~10重量%を含んだリン酸緩衝液1~5mlに懸濁し、あらかじめ3-ケトペンタンニトリルを2.5~25mg入れた試験管に加えて、2~3日間30°Cで振とうする。この反応の際、酵母を破碎してから実施しても良い。また、NAD<sup>+</sup>及び/又はNADP<sup>+</sup>と、グルコース脱水素酵素及びグルコース、もしくは、ギ酸脱水素酵素及びギ酸を添加してもよい。変換反応の後、適当な有機溶媒で抽出を行い、生成する3-ヒドロキシペンタンニトリルをキャピラリーガスクロマトグラフィー等で分析すればよい。

[0031] 本発明のアセトアセチルCoA還元酵素の由来としては、例えば、アクロモバクター(Achromobacter)属細菌を挙げることができ、好ましくはアクロモバクター・キシリソキ

シダンス・サブスピー・デニトリフィカنس (Achromobacter xylosoxidans subsp. denitrificans)、より好ましくはアクロモバクター・キシロソキシダンス・サブスピー・デニトリフィカنس (Achromobacter xylosoxidans subsp. denitrificans) IFO15 125株である。

- [0032] 以下に、3-ケトペンタンニトリルを不斉還元して(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルを生成する能力を有する微生物から、本発明のアセトアセチルCoA還元酵素を取得する方法を記載するが、本発明はこれに限定されない。
- [0033] 微生物を適切な培地で培養し、培養液から菌体を遠心分離した後、菌体を適當な緩衝液中に懸濁する。該菌体をグラスビーズ等の物理的手法、酵素等の生化学的手法等を用いて破碎又は溶解し、更に遠心分離等により該溶液中の固形物を除去することにより、本発明の酵素を含む溶液を得ることができる。あるいは、培養液から菌体を分離することなく、直接上記と同様の方法で酵素溶液を得ることもできる。
- [0034] また、当業者が通常用いる酵素の精製手法、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、透析、クロマトグラフィーを単独で又は組み合わせて実施しても良い。クロマトグラフィーとしては、例えば、疎水クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル滻過クロマトグラフィー等が挙げられる。これにより、不要なタンパク質を含まない、より純度の高い酵素溶液を得ることができる。
- [0035] 本発明のアセトアセチルCoA還元酵素をコードするDNAは、上述のアセトアセチルCoA還元酵素をコードするDNAであればいずれも含まれる。例えば、配列表の配列番号2で示される塩基配列からなるDNAを挙げることができる。
- [0036] 以下に、本発明の酵素をコードするDNAを取得する方法の例を記載するが、本発明はこれに限定されない。
- まず、精製した酵素を適當なエンドペプチダーゼにより消化し、逆相HPLCにより切断された断片を精製後、プロテインシークエンサーにより部分アミノ酸配列の一部を決定する。そして、得られた部分アミノ酸配列をもとにして、PCR (Polymerase Chain Reaction) プライマーを合成する。次に、該DNAの起源となる微生物より、通常のDNA単離法、例えばHereford法 (Cell, 18, 1261(1979)) により、該微生物の染色体DNAを調製する。この染色体DNAを鑄型として、先述のPCRプライマーを

用いてPCRを行い、該ポリペプチドをコードするDNAの一部を増幅(コア配列)し、塩基配列決定を行う。塩基配列決定はジデオキシ・チェイン・ターミネーション法等により決定し得る。例えば、ABI 373A DNA Sequencer(Applied Biosystems社製)等を用いて行われ得る。

- [0037] 次に、コア配列の周辺領域の塩基配列を明らかにするために、該微生物の染色体DNAを、コア配列中にその認識配列が存在しない制限酵素により消化し、生成したDNA断片をT4リガーゼにより自己環化させることにより、逆PCR (Inverse PCR) (Nucleic Acids Res. 16, 8186 (1988))用の鑄型DNAを調製する。次に、コア配列をもとに、コア配列の外側に向かうDNA合成の開始点となるプライマーを合成し、逆PCRによりコア配列の周辺領域を増幅する。こうして得られたDNAの塩基配列を明らかにすることにより、目的のアセトアセチルCoA還元酵素の全コード領域のDNA配列を明らかにし得る。
- [0038] 本発明のアセトアセチルCoA還元酵素をコードするDNAを宿主微生物内に導入し、それをその導入された宿主微生物内で発現させるために用いられるベクターとしては、適切な宿主微生物内で該ポリペプチド遺伝子を発現できるものであればいずれもが用いられ得る。このようなベクターとしては、例えば、プラスミドベクター、ファージベクター、コスミドベクター等が挙げられる。また、他の宿主株との間での遺伝子交換が可能なシャトルベクターも使用され得る。  
このようなベクターは、作動可能に連結されたプロモーター(lacUV5プロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、lppプロモーター、tufBプロモーター、recAプロモーター、pLプロモーター)等の制御因子を含み、本発明のDNAと作動可能に連結された発現単位を含む発現ベクターとして好適に用いられ得る。例えば、pUCNT (WO94/03613) 等が好適に用いられ得る。
- [0039] 本明細書で用いる用語「制御因子」は、機能的プロモーター、及び、任意の関連する転写要素(例えばエンハンサー、CCAATボックス、TATAボックス、SPI部位等)を有する塩基配列をいう。  
本明細書で用いる用語「作動可能に連結」は、遺伝子が発現するように、DNAが、その発現を調節するプロモーター、エンハンサー等の種々の調節エレメントとが宿主

細胞中で作動し得る状態で連結されることをいう。制御因子のタイプ及び種類が、宿主に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。

- [0040] 本発明のDNAを有するベクターを導入する宿主細胞としては、細菌、酵母、糸状菌、植物細胞、動物細胞等が挙げられ、導入の容易さや発現効率の観点からは細菌が好ましく、大腸菌が特に好ましい。

本発明のDNAは、定法により宿主細胞に導入し得る。宿主細胞として大腸菌を用いた場合、例えば塩化カルシウム法により本発明のDNAを導入することができる。

- [0041] 本発明のアセトアセチルCoA還元酵素もしくは該還元酵素の生産能を有する形質転換体を用いて、3-ケトペンタンニトリルを不斉還元し、光学純度99%e. e. 以上の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルを合成する場合、補酵素としてNADPH又はNADHが必要となる。反応系にNADPH又はNADHを必要な量だけ添加しても実施しうるが、酸化された該補酵素(NADP<sup>+</sup>又はNAD<sup>+</sup>)を還元型(NADPH又はNADH)に変換する能力(以後、補酵素再生能力と呼ぶ)を有する酵素をその基質と共に、つまり補酵素再生系を本発明の酵素と組み合わせて反応を行うことにより、高価な補酵素の使用量を大幅に削減することができる。

- [0042] 補酵素再生能力を有する酵素としては、ヒドログナーゼ、ギ酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素及びグルコース脱水素酵素等を用いることができる。好適には、グルコース脱水素酵素、ギ酸脱水素酵素が用いられ、特にグルコース脱水素酵素が好ましい。

このような反応は、補酵素再生系を不斉還元反応系内に添加することによっても行われ得るが、本発明の酵素をコードするDNA及びグルコース脱水素酵素をコードするDNAの両者により形質転換された形質転換体を触媒とした場合は、補酵素再生能を有する酵素を別に調製して反応系内に添加しなくとも、効率的に反応を行うことができる。

- [0043] このような形質転換体は、本発明のアセトアセチルCoA還元酵素をコードするDNA及びグルコース脱水素酵素をコードするDNAを、同一のベクターに組み込み、これを宿主細胞に導入することにより得られる他、これら2種類のDNAを不和合性グループの異なる2種のベクターにそれぞれ組み込み、それらを同一の宿主細胞に導入す

ることによっても得られ得る。

[0044] なお、上述のように、本発明の組換えベクターは、上記アセトアセチルCoA還元酵素をコードするDNA、又は、配列表の配列番号2で示される塩基配列からなるDNAを含有するものである。好ましくは、後述の図2においてpNTAXで示される組換えベクター等が挙げられる。

また、当該組換えベクターとしては、上記グルコース脱水素酵素をコードするDNAを更に含有するものも挙げられる。なお、上記グルコース脱水素酵素が、バシラス・メガテリウム(*Bacillus megaterium*)由来のものであることが好ましい。

[0045] 本発明の形質転換体は、上記組換えベクターを用いて宿主細胞を形質転換して得られたものである。

また、上記アセトアセチルCoA還元酵素をコードするDNA、又は、配列表の配列番号2で示される塩基配列からなるDNAを含有する第1の組換えベクター、及び、グルコース脱水素酵素をコードするDNAを含有する第2の組換えベクターを用いて、宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体が好ましい。

より好ましい形質転換体としては、第1の組換えベクターが前記pNTAXであり、前記グルコース脱水素酵素がバシラス・メガテリウム(*Bacillus megaterium*)由来のものである形質転換体；第1の組換えベクターが前記pNTAXであり、第2の組換えベクターが後述の図2においてpSTVGで示される組換えベクターである形質転換体等が挙げられる。

なお、宿主細胞としては、大腸菌が好ましい。

[0046] また、本発明の形質転換体として、具体的には、

組換え大腸菌E. coli HB101(pNTAX) (受託番号FERM BP-10126、原寄託日平成15年10月23日の国内寄託をブダペスト条約に基づく国際寄託に移管)、

組換え大腸菌E. coli HB101(pNTAX, pSTVG) (受託番号FERM P-19567、寄託日平成15年10月23日)

等が挙げられ、それぞれ、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6にある独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。

[0047] 次に、3-ケトペンタンニトリルをアセトアセチルCoA還元酵素で不斉還元して、(R)-

3-ヒドロキシペンタンニトリルを製造する方法について詳述する。

- [0048] 本方法に用いるアセトアセチルCoA還元酵素は、その起源を問わず使用することができる。微生物由来のものだけでなく、動物又は植物由来のものでも良い。
- [0049] 例えば、アシネトバクター・エスピー (*Acinetobacter* sp.) RA3849由来のアセトアセチルCoA還元酵素 (J. Bacteriol., 177, 4501–4507(1995))、ラルストニア・ユートロファ (*Ralstonia eutropha*) 由来のアセトアセチルCoA還元酵素 (FEMS Microbiol. Lett., 52, 259–264(1988))、アルカリゲネス・ラタス (*Alcaligenes latus*) 由来のアセトアセチルCoA還元酵素 (J. Microbiol. Biotechnol., 6, 425–431(1996))、アゾスピリラム・ブラシレンス (*Azospirillum brasilense*) 由来のアセトアセチルCoA還元酵素 (J. Gen. Microbiol., 136, 1191–1196(1990)、Mol. Gen. Genet., 231, 375–384(1992))、アゾトバクター・バイジェリンキー (*Azotobacter beijerinckii*) 由来のアセトアセチルCoA還元酵素 (Biochem. J., 134, 225–238(1973))、バチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) 由来のアセトアセチルCoA還元酵素 (Can. J. Microbiol., 41 (Suppl. 1), 77–79(1995))、クロマチウム・ビノーサム (*Chromatium vinosum*) D株由来のアセトアセチルCoA還元酵素 (Eur. J. Biochem., 209, 135–150(1992))、エクトチオロドスピラ・シャポシュニコビー (*Ectothiorhodospira shaposhnikovii*) 由来のアセトアセチルCoA還元酵素 (Appl. Microbiol. Biotechnol., 40, 292–300(1993))、ルピナス・ルテウス (*Lupinus luteus*) 由来のアセトアセチルCoA還元酵素 (Plant Soil, 56, 379–390(1980))、メチロバクテリウム・エクストークエンス (*Methylobacterium extorquens*) 由来のアセトアセチルCoA還元酵素 (FEMS Microbiol. Lett., 156, 275–279(1997))、メチロバクテリウム・ロデシアナム (*Methylobacterium rhodesianum*) MB126由来のアセトアセチルCoA還元酵素 (Arch. Microbiol., 161, 277–280(1994))、パラコッカス・デニトリフィカанс (*Paracoccus denitrificans*) 由来のアセトアセチルCoA還元酵素 (FEMS Microbiol. Rev., 103, 257–264(1992)、FEMS Microbiol. Lett., 133, 85–90(1995))、リゾビウム・ルピニ (*Rhizobium lupini*) 由来のアセトアセチルCoA還元酵素 (Fizio 1. Rast. (Moscow), 27, 544–550(1980))、リゾビウム・メリロティ (*Rhizobium*

meliloti) 41由来のアセトアセチルCoA還元酵素(Microbiology, 141, 2553–2559(1995))、ロドコッカス・ルーバー(Rhodococcus ruber)NCIMB40126由来のアセトアセチルCoA還元酵素(FEMS Microbiol. Rev., 103, 93–101(1992))、シネコッカス・エスピー(Synechococcus sp.)由来のアセトアセチルCoA還元酵素(特開平08–187085号公報)、シントロフォモナス・ウォルフェイ・サブスピーシーズ・ウォルフェイ(Syntrophomonas wolfei subsp. wolfei)由来のアセトアセチルCoA還元酵素(Arch. Microbiol., 159, 16–20(1993))、チオカプサ・フェニギー(Thiocapsa pfennigii)由来のアセトアセチルCoA還元酵素(Appl. Microbiol. Biotechnol., 40, 292–300(1993))、ズーグロエア・ラミグラ(Zoogloea ramigera)I–16–M由来のアセトアセチルCoA還元酵素(Arch. Microbiol., 114, 211–217(1977)、J. Biol. Chem. 262, 97–102(1987))等、既知のアセトアセチルCoA還元酵素等が挙げられる。

- [0050] また、先に詳述した本発明の新規アセトアセチルCoA還元酵素であってもよく、例えば、配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができる。
- [0051] 更に、本方法に用いるアセトアセチルCoA還元酵素として、以下の(c)–(e)のいずれかのポリペプチドを挙げることができる。
- (c)配列表の配列番号3に示したアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- (d)配列表の配列番号3に示したアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が付加、欠失又は置換したアミノ酸配列からなり、3–ケトペンタンニトリルを不斉還元し、光学純度95%e. e. 以上の(R)–3–ヒドロキシペンタンニトリルを生成する活性を有するポリペプチド、
- (e)配列表の配列番号4に示した塩基配列と相補する塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするポリペプチドであり、かつ、3–ケトペンタンニトリルを不斉還元し、光学純度95%e. e. 以上の(R)–3–ヒドロキシペンタンニトリルを生成する活性を有するポリペプチド。
- [0052] 本ポリペプチドの由来としては、ラルストニア(Ralstonia)属に属する微生物が好ましく、特に好ましくはラルストニア・ユートロファ(Ralstonia eutropha)である。

- [0053] 配列表の配列番号4に示した塩基配列と相補する塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、配列表の配列番号4に示した全塩基配列に対して相補的な塩基配列を有するDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ラーク・ハイブリダイゼーション法、あるいはサザン・ハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味する。具体的には、コロニーあるいはラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる)を用い、65℃の条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAを挙げることができる。
- [0054] ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A laboratory manual, second edition(Cold Spring Harbar Laboratory Press, 1989年)等に記載されている方法に準じて行うことができる。
- [0055] ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列表の配列番号4に示した塩基配列と、配列同一性が60%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは95%以上のDNAを挙げることができ、コードされるポリペプチドが、3-ケトペンタンニトリルを不斉還元し、光学純度95%e. e. 以上の(R)-3-ヒドロキシペンタニトリルを生成する活性を有する限り、本発明に使用することができる。
- [0056] ここで、「配列の同一性(%)」とは、対比される2つのDNAを最適に整列させ、核酸塩基(例えば、A、T、C、G、U、又はI)が両方の配列で一致した位置の数を比較塩基総数で除し、そして、この結果に100を乗じた数値で表される。
- [0057] 上記のアセトアセチルCoA還元酵素を3-ケトペンタンニトリルに作用させることにより、光学純度95%e. e. 以上の(R)-3-ヒドロキシペンタニトリルを得ることができる。特に、前述した新規アセトアセチルCoA還元酵素を用いた場合には、光学純度99%e. e. 以上の極めて光学純度の高い(R)-3-ヒドロキシペンタニトリルを得ることができる。
- [0058] なお、上記のアセトアセチルCoA還元酵素のアミノ酸配列もしくは該酵素をコードするDNAの塩基配列が既に明らかな場合は、先に詳述した本発明の新規アセトアセ

チルCoA還元酵素の場合と同様に操作することで、該酵素を大量発現する形質転換体を調製し、この形質転換体又はその培養物を用いて還元反応を行ってもよい。

[0059] ここで、上述の組換えベクター以外に、配列表の配列番号4で示される塩基配列からなるDNAを含有し、後述の図3においてpNTREとして示される組換えベクター等も用いることができる。

[0060] 更に、上述の形質転換体以外に、以下の形質転換体等も用いることができる。

組換え大腸菌E. coli HB101 (pNTRE) (受託番号FERM P-19566、寄託日平成15年10月23日)、

組換え大腸菌E. coli HB101 (pNTRE, pSTVG) (受託番号FERM BP-10125、原寄託日平成15年10月23日の国内寄託をブダペスト条約に基づく国際寄託に移管)。

これらはそれぞれ、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6にある独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。

[0061] アセトアセチルCoA還元酵素を発現させた形質転換体を用いて、3-ケトペンタンニトリルを還元して(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルを製造する場合、以下のように実施され得る。但し、以下の方法に限定されるわけではない。

[0062] まず最初に、適当な溶媒中に、基質3-ケトペンタンニトリルもしくは3-ケトペンタンニトリルアルカリ金属塩(例えば3-ケトペンタンニトリルのナトリウム塩等)を加え、NAD<sup>+</sup>等の補酵素、及び該形質転換体の培養物を添加し、pH調整下、攪拌して反応させる。この反応は、5~80°C、好ましくは10~60°C、より好ましくは20~40°Cの温度で行われ、反応中、反応液のpHは3~10、好ましくは4~9、より好ましくは5~8に維持する。反応はバッチ式あるいは連続方式で行われ得る。

[0063] バッチ方式の場合は、反応基質は0.01~70% (w/v)、好ましくは0.1~50%、より好ましくは0.5~30%の仕込み濃度で添加されうる。反応の途中で基質である3-ケトペンタンニトリルを添加する場合は、3-ケトペンタンニトリルをそのまま添加しても良いし、また、3-ケトペンタンニトリルアルカリ金属塩(例えば3-ケトペンタンニトリルのナトリウム塩等)を添加しても良い。

[0064] なお、形質転換体の培養は、その微生物が増殖する限り、通常の、炭素源、窒素源

、無機塩類、有機栄養素等を含む液体栄養培地を用いて行い得る。また、培養温度は、好ましくは4—50℃である。

ここで形質転換体の培養物とは、培養液、菌体は言うまでもなく、凍結乾燥菌体、アセトン乾燥菌体、あるいはそれらの磨碎物、粗酵素液、精製酵素であってもよく、更に公知の手段で固定化された固定化酵素若しくは固定化菌体であってもよい。

[0065] また、本反応を行う際、形質転換体としてアセトアセチルCoA還元酵素とグルコース脱水素酵素の両者を生産するものを用いる場合、反応系に更にグルコースを添加することによって、補酵素の使用量を大幅に減らすことが可能となる。

[0066] 反応液からの(R)—3—ヒドロキシペンタンニトリルの採取方法は特に限定されないが、反応液から直接、あるいは菌体等を分離後、酢酸エチル、トルエン、t—ブチルメチルエーテル、ヘキサン、塩化メチレン等の溶剤で抽出し、脱水後、蒸留あるいはシリカゲルカラムクロマトグラフィー等により精製すれば、高純度の(R)—3—ヒドロキシペンタニトリルが容易に得られる。

[0067] また、下記一般式(3)

[0068] [化4]



[0069] (式中、Rは置換されていても良く、分岐していても良い低級アルキル基を示す)で示されるアセト酢酸エステルに、アセトアセチルCoA還元酵素を作用させることにより、下記一般式(4)

[0070] [化5]



[0071] (式中、Rは前記と同じ)で示される(R)—3—ヒドロキシブタン酸エステルを効率的に製造することができる。

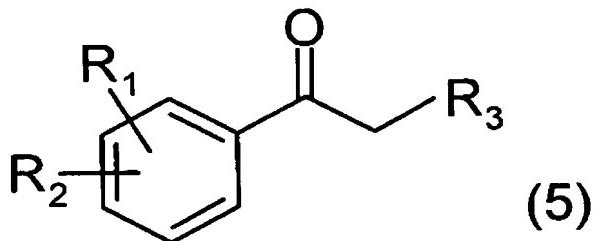
[0072] Rの低級アルキル基としては、分岐していても良い炭素数1—5のアルキル基が好ま

しく、より好ましくはメチル基、エチル基である。また、当該低級アルキル基は置換されていても良く、置換基としては、例えばハロゲン原子、水酸基、アルコキシ基、ニトロ基、アミノ基等が挙げられる。

[0073] 本反応に用いるアセトアセチルCoA還元酵素は、アセト酢酸エステルを(R)-3-ヒドロキシブタン酸エステルへ還元するものであれば、その起源を問わず使用することができ、本発明の新規アセトアセチルCoA還元酵素や前記の既知のアセトアセチルCoA還元酵素を好適に用いることができる。また、これら酵素を大量発現させた形質転換体を先に述べた方法と同様に育種し、これを用いることもできる。本反応は、先に述べた3-ケトペンタンニトリルの還元反応と同様に実施すればよい。

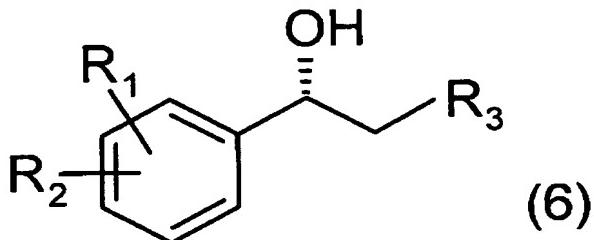
[0074] また、下記式(5)：

[0075] [化6]



[0076] (式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>は水素原子、ハロゲン原子、アルコキシ基、又はニトロ基を示し、それぞれ同一でも異なっていてもよい。またR<sub>3</sub>は水素原子、ハロゲン原子、水酸基、又は置換されていてもよいアルキル基を示す)で表される1-フェニルエタノン誘導体に、アセトアセチルCoA還元酵素を作用させることにより、下記式(6)

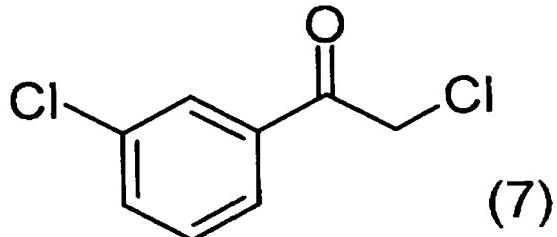
[0077] [化7]



[0078] (式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>は前記と同じ)で表される光学活性1-フェニルエタノール誘導体を効率的に製造することができる。

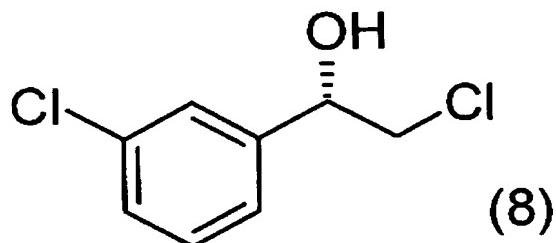
特に、下記式(7)：

[0079] [化8]



[0080] で表される2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノンに、アセトアセチルCoA還元酵素を作用させることにより、下記式(8)

[0081] [化9]



[0082] で表される(R)-2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールを効率的に製造することができる。

[0083]  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ におけるハロゲン原子としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子が挙げられる。

$R_1$ 、 $R_2$ におけるアルコキシ基としては、炭素数1～3のアルコキシ基であり、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基等が挙げられる。好ましくはメトキシ基である。

$R_3$ におけるアルキル基としては、炭素数1～8のアルキル基であり、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ヘキシリル基、オクチル基等が挙げられる。好ましくは炭素数1～2のアルキル基である。なお、当該アルキル基は、置換基を有してもよく、置換基としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、水酸基、アミノ基等が挙げられる。

[0084] 本反応に用いるアセトアセチルCoA還元酵素は、1-フェニルエタノン誘導体を光学活性1-フェニルエタノール誘導体へ還元する活性、特に2-クロロ-1-(3'-クロロフ

エニル)エタノンを(R)-2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールへ還元する活性を有するものであれば、その起源を問わず使用することができる。本発明の新規アセトアセチルCoA還元酵素や前記の既知のアセトアセチルCoA還元酵素を好適に用いることができる。また、これら酵素を大量発現させた形質転換体を先に述べた方法と同様に育種し、これを用いることもできる。本反応は、先に述べた3-ケトペンタンニトリルの還元反応と同様に実施すればよい。

### 発明の効果

[0085] 本発明によれば、高光学純度の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリル、(R)-3-ヒドロキシブタン酸エステル、光学活性1-フェニルエタノール誘導体といった有用な光学活性アルコールを、簡便な方法で製造することができる。とりわけ、(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルに関しては、95%e. e. 以上、本発明の新規アセトアセチルCoA還元酵素を用いれば99%e. e. 以上の、従来にない極めて高い光学純度の製品を得ることが可能である。

### 発明を実施するための最良の形態

[0086] 以下、実施例により本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。なお、以下の記載において、「%」は特に断らない限り「重量%」を意味する。

[0087] また、生成した3-ヒドロキシペンタンニトリルの量及び光学純度については、下記キャピラリーガスクロマトグラフィー条件で分析して求めた。

#### [キャピラリーガスクロマトグラフィー分析条件]

カラム:Chiradex G-TA (20m×0.25mm) (ASTEC社製)、検出:FID

カラム温度:120°C

注入温度:200°C

検出温度:200°C

キャリアーガス:ヘリウム(100kPa)

スプリット比:100/1

溶出時間:(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリル 4. 37分、(S)-3-ヒドロキシペンタンニトリル 5. 17分

[0088] (実施例1)アクロモバクター・キシロソキシダンス・サブスピー・デニトリフィカنس IF O15125株からの新規アセトアセチルCoA還元酵素の精製

3-ケトペンタンニトリルから3-ヒドロキシペンタンニトリルへの還元活性は、以下のように測定した。3-ケトペンタンニトリル5mg及びNADPH30mgを入れた試験管に、1Mリン酸緩衝液(pH6.5)0.05ml及びポリペプチド(酵素)溶液0.45mlを加えて、30℃で1時間振とうした。これに酢酸エチル1mlを加えて十分に攪拌後、遠心分離した。有機層について上記キャピラリーガスクロマトグラフィー条件で分析を行い、生成した3-ヒドロキシペンタンニトリル量を求めた。この条件において、1分間に $1\mu\text{mol}$ の3-ヒドロキシペンタンニトリルを生成させる還元活性を1unitと定義した。また、3-ヒドロキシペンタンニトリルの光学純度についても、上記キャピラリーガスクロマトグラフィー条件で分析して求めた。

- [0089] 肉エキス10g、ペプトン10g、酵母エキス5g、塩化ナトリウム3g(いずれも1L当たり)の組成からなる液体培地(pH7)100mlを坂口フラスコに分注し、120℃で20分間蒸気殺菌を行った。この液体培地を10本用意し、これにアクロモバクター・キシロソキシダンス・サブスピー・デニトリフィカヌス(Achromobacter xylosoxidans subsp. denitrificans)IFO15125株を無菌的に一白金耳接種して、30℃で40時間振とう培養した。得られた培養液500mlについて、遠心分離により菌体を集め、10mMリン酸緩衝液(pH7.0)200mlで洗浄し、湿菌体を1mMとなるように $\beta$ -メルカプトエタノールを添加した10mMリン酸緩衝液(pH7.0)30mlに懸濁した。そして、菌体を超音波破碎機(プランソン社製)で破碎し、遠心分離にて菌体残渣を除き、無細胞抽出液25mlを取得した。これを1mMの $\beta$ -メルカプトエタノールを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.0)であらかじめ平衡化したTOYOPEARL DEAE-650M(東ソー社製)カラム(10ml)に供し、酵素を吸着させた後、塩化ナトリウム濃度(0mMから500mMまで)を段階的に上げて溶出を行い、3-ケトペンタンニトリルの還元活性を有する画分を取得した。活性画分を集め、1mMの $\beta$ -メルカプトエタノールを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.0)であらかじめ平衡化したHiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)カラムに供した。活性画分について、更に1mMの $\beta$ -メルカプトエタノールを含む20mMリン酸緩衝液(p

H7. 0)であらかじめ平衡化した2'5'ADP Sepharose 4B(アマシャム ファルマシアバイオテク社製)カラム(18ml)に供し、酵素を吸着させた後、塩化ナトリウム濃度(0mMから1. 0Mまで)のリニアグラジエントにより活性画分を溶出させた。以上の精製操作により、電気泳動的にほぼ単一な精製ポリペプチド標品を得た。SDSポリアクリルアミド電気泳動分析におけるバンドの分子量は、アマシャム・バイオサイエンス(Amersham Bioscience)社製のLMW Calibration Kit For SDS-Electrophoresisのプロトコールに従って決定した。その結果、当該分子量は約26000であった。本精製酵素を、NADPH存在下で3-ケトペンタンニトリルに作用させると、光学純度99. 2%e. e. の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルが生成した。以後、本アセトアセチルCoA還元酵素をRAXと呼ぶこととした。

#### [0090] (実施例2) 酵素の性質の測定

得られたRAXの酵素化学的性質について調べた。

##### (1) 作用

NADPHを補酵素として、3-ケトペンタンニトリルに作用して、光学純度99. 2%e. e. の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルへ還元した。NADPHのかわりにNADHを補酵素として、実施例1に記載の方法で3-ケトペンタンニトリル還元活性を測定したところ、NADPHを補酵素とした場合の約15%の活性を示した。

更に、アセトアセチルCoA及び4-クロロアセト酢酸エチルに対する還元活性を調べた。100mMリン酸緩衝液(pH6. 5)に、アセトアセチルCoA 0. 25mMもしくは4-クロロアセト酢酸エチル10mM、NADPH 0. 25mM及び酵素を含む反応液を30°Cで反応させ、NADPHの消費に伴う波長340nmの吸光度の減少を測定することにより、それぞれの基質に対する還元活性を求めた。この反応条件において、1分間に1 μ molのNADPHをNADP<sup>+</sup>に酸化する酵素活性を1unitと定義した。その結果、アセトアセチルCoA、4-クロロアセト酢酸エチルの両化合物に対して還元活性を有しており、実施例1に記載の方法で求めた3-ケトペンタンニトリルに対する還元活性のそれぞれ約7. 6倍、約3. 2倍の値を示した。

#### [0091] (2) 作用至適温度

RAXの作用至適温度を調べるため、10ー50°Cにおける4-クロロアセト酢酸エチル

還元活性を測定した。活性測定は、100mMリン酸緩衝液(pH6.5)に、基質4-クロロアセト酢酸エチル10mM、補酵素NADPH0.25mM及び酵素を添加し、10～50°Cで3分間反応させ、波長340mMの吸光度の減少を測定することにより行った。その結果、至適温度は27～33°Cであった。

[0092] (3)作用至適pH

RAXの作用至適pHを調べるため、pH4～9における4-クロロアセト酢酸エチル還元活性を測定した。酵素活性は、緩衝液に、基質4-クロロアセト酢酸エチル10mM、補酵素NADPH0.25mM及び酵素を添加し、30°Cで3分間反応させ、波長340mMの吸光度の減少を測定することにより行った。緩衝液として100mMリン酸緩衝液、100mM酢酸緩衝液もしくは100mMトリス塩酸緩衝液を用いて、pH4～9の範囲で活性を測定した。その結果、至適pHは5.5～6.5であった。

[0093] (4)阻害剤

4-クロロアセト酢酸エチルに対する還元活性を、各種化合物及び金属塩を添加した条件で測定した。活性測定は、100mMリン酸緩衝液(pH6.5)に基質4-クロロアセト酢酸エチル10mM、補酵素NADPH0.25mM、酵素及び阻害剤を添加し、30°Cで3分間反応させ、波長340mMの吸光度の減少を測定することにより行った。阻害剤を添加しない時の活性を100%とし、阻害剤添加時の活性を相対活性で表1にまとめた。

[0094] [表1]

阻害剤	濃度 (mM)	相対活性
なし	-	100
ヨード酢酸	1.0	98
N-エチルマレイミド	1.0	103
p-クロロメルクリ安息香酸	1.0	0
フッ化フェニルメチルスルホニル	1.0	108
EDTA	1.0	83
MgSO <sub>4</sub>	1.0	100
MnCl <sub>2</sub>	1.0	97
ZnSO <sub>4</sub>	1.0	81
CoCl <sub>2</sub>	1.0	108
CuSO <sub>4</sub>	1.0	0
AgNO <sub>3</sub>	0.1	0
HgCl <sub>2</sub>	0.01	0

[0095] その結果、酵素活性はp-クロロメルクリ安息香酸、硫酸銅、硝酸銀、塩化水銀により阻害された。

#### (5) 分子量

溶離液として150mMの塩化ナトリウムを含む50mMリン酸緩衝液(pH7.0)を用い、Superdex 200 HR 10/30(ファルマシアバイオテック社製)による精製酵素のゲル滻過クロマトグラフィー分析を行った結果、標準タンパク質との相対保持時間から算出した本酵素の分子量は約85500であった。

#### [0096] (実施例3)RAX遺伝子のクローニング

実施例1で得られた精製酵素を8M尿素存在下で変性させた後、アクロモバクター由来のリシルエンドペプチダーゼ(和光純薬工業社製)で消化し、得られたペプチド断片のアミノ酸配列をエドマン法により決定した。

上記アミノ酸配列から予想されるDNA配列を考慮し、プライマー1(5'-CARGGNTAYACNTTYTAYG-3'(配列番号5)及びプライマー2(5'-GC DATYTCYTCNGGNGTYCC-3'(配列番号6)を合成した。プライマー2種(プライマー1及びプライマー2)各100pmol、アクロモバクター・キシロソキシダンス・サブスピ一・デニトリフィカンス IFO15125株の染色体DNA866ng、dNTP(デオキシヌクレオチド三リン酸)各10nmol、ExTaq(宝酒造社製)2.5Uを含むExTaq用緩衝液100μlを調製し、熱変性(96℃、1分)、アニーリング(50℃、1分)、伸長反応(72℃、1分)を30

サイクルを行い、4°Cまで冷却後、アガロースゲル電気泳動により増幅DNAを確認した。

- 
- [0097] 本反応に用いたアクロモバクター・キシロソキシダンス・サブスピー・デニトリフィカンス IFO15125株の染色体DNAの調製は、分子生物学実験プロトコール1(丸善)P. 36に記載されている細菌ゲノムDNAの少量調製法により行った。増幅DNAをpT7 Blue Vector(Novagen社製)にサブクローニングし、その塩基配列を決定した。その結果、増幅DNAはプライマー配列を含めて503塩基からなっていた。その配列は、図1に示したDNA配列において、二重下線を引いたDNA配列部分である。以後この配列を「コア配列」と記す。
- [0098] コア配列の5'一側に近い部分の塩基配列を元に、その相補配列となるプライマー3'(5'-CGTCGGCGCTCATCTTGCGAACAG-3':配列番号7)を作成し、更に3'一側に近い部分の塩基配列を元に、プライマー4(5'-AGGGCATCACGGTC AACACGGTGTC-3':配列番号8)を作製した。逆PCRの鑄型として、まずアクロモバクター・キシロソキシダンス・サブスピー・デニトリフィカンス IFO15125株の染色体DNAを制限酵素SphIにより消化し、消化物をT4DNAリガーゼを用いて自己閉環した。この自己閉環物300ng、プライマー2種(プライマー3及びプライマー4)各50pmol、dNTP各10nmol、ExTaq(宝酒造社製)2.5Uを含むExTaq用緩衝液50μlを調製し、熱変性(97°C、0.5分)、アニーリング(68°C、1分)、伸長反応(72°C、5分)を30サイクルを行い、4°Cまで冷却後、アガロースゲル電気泳動により増幅DNAを確認した。
- [0099] 増幅DNAをpT7Blue Vector(Novagen社製)にサブクローニングし、その塩基配列を決定した。この結果とコア配列の結果より、RAXをコードする遺伝子の全塩基配列を決定した。全塩基配列を配列表の配列番号15に示した。また、全塩基配列及び該遺伝子がコードする推定アミノ酸配列を図1にまとめた。図1中、一重下線は、精製RAXをリジルエンドペプチダーゼ消化して生じたペプチド断片において、エドマン法により決定できたアミノ酸配列を示す。
- [0100] (実施例4)RAX遺伝子を含む組換えベクターの作製  
大腸菌においてRAXを発現させるために、形質転換に用いる組換えベクターを作製

した。まず、RAX遺伝子の開始コドン部分にNdeI部位を付加し、かつ終始コドンの直後に新たな終始コドンとEcoRI部位を付加した二本鎖DNAを以下の方法により取得した。

実施例3で決定した塩基配列に基づき、RAX遺伝子の開始コドン部分にNdeI部位を付加したプライマー5(5'-GTACATATGAGCGGAAACTGGCTTACG-3' :配列番号9)、及びRAX遺伝子の終始コドンの直後に新たな終始コドンとEcoRI部位を付加し、更にNdeI部位を破壊するために一塩基置換したプライマー6(5'-G TAGAATTCTTATCAGCCCATGTGCAGGCCGCCG-3' :配列番号10)を合成した。プライマー2種(プライマー5及びプライマー6)各100pmol、アクロモバクター・キシロソキシダンス・サブスピー・デニトリフィカンス IFO15125株の染色体DNA132ng、dNTP各20nmol、ExTaq(宝酒造社製)2.5Uを含むExTaq用緩衝液100μlを調製し、熱変性(97°C、0.5分)、アニーリング(65°C、1分)、伸長反応(72°C、1分)を30サイクル行い、4°Cまで冷却後、アガロースゲル電気泳動により増幅DNAを確認した。この増幅断片をNdeI及びEcoRIで消化し、プラスミドpUCNT(WO94/03613)のlacプロモーターの下流のNdeI、EcoRI部位に挿入することにより、組換えベクターpNTAXを得た。pNTAXの作製法及び構造を図2に示す。

[0101] (実施例5)RAX遺伝子及びグルコース脱水素酵素遺伝子の両者を同時に含む組換えベクターの作製

バシラス・メガテリウム(*Bacillus megaterium*)IAM1030株由来のグルコース脱水素酵素(以後GDHと記す)の遺伝子の開始コドンから5塩基上流に大腸菌のShine-Dalgarno配列(9ヌクレオチド)を、更にその直前にEcoRI切断点を、また、終始コドンの直後にSalI切断点を付加した二本鎖DNAを、以下の方法により取得した。

[0102] GDH遺伝子の塩基配列情報を基に、GDHの構造遺伝子の開始コドンから5塩基上流に大腸菌のShine-Dalgarno配列(9ヌクレオチド)を、更にその直前にEcoRI切断点を付加したプライマー7(5'-GCCGAATTCTAACGGAGGTTAACAAATGTATAAAGATTAGAAGG-3' :配列番号11)と、終始コドンの直後にSalI部位を付加したプライマー8(5'-GCGGTCGACTTATCCGCGTCCTGCTTGG-3' :配列番号12)を常法に従って合成した。これら2つのプライマーを用いて、プラスミドp

GDK1(Eur. J. Biochem., 186, 389(1989))を鋳型としてPCRによる二本鎖DNAを合成した。得られたDNA断片をEcoRI及びSalIで消化し、実施例4において構築したpNTAXのEcoRI-SalI部位に挿入した組換えベクターpNTAXGを得た。pNTAXGの作製法及び構造を図2に示す。

[0103] (実施例6)RAXを生産する組換え大腸菌の作製

実施例4で得た組換えベクターpNTAX及び実施例5で得た組換えベクターpNTAXGを用いて、大腸菌HB101(宝酒造社製)を形質転換し、各々から組換え大腸菌HB101(pNTAX)及びHB101(pNTAXG)を得た。組換え大腸菌HB101(pNTAX)(受託番号FERM BP-10126、原寄託日平成15年10月23日の国内寄託をブダペスト条約に基づく国際寄託に移管)は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。

[0104] また、実施例5で作成した組換えベクターpNTAXGをEcoRI及びPstIで二重消化して得られるGDH遺伝子を含む約0.8kbのDNA断片を、プラスミドpSTV28(宝酒造社製)のEcoRI-PstI部位に挿入して、組換えベクターpSTVGを構築した。pSTVGの作製法及び構造を図2に示す。このpSTVGで、予め塩化カルシウム法でコンピテント化しておいた組換え大腸菌HB101(pNTAX)を形質転換し、組換え大腸菌HB101(pNTAX, pSTVG)を得た。こうして得られた形質転換体である組換え大腸菌HB101(pNTAX, pSTVG)(受託番号FERM P-19567、寄託日平成15年10月23日)は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。

[0105] (実施例7)組換え大腸菌におけるRAX及びGDHの発現

バクト・トリプトン1.6%(w/v)、バクト・イーストエキス1.0%(w/v)、NaCl0.5%(w/v)の組成からなる2×YT培地(pH7)50mlを500ml容坂口フラスコに分注し、120°Cで20分間蒸気殺菌を行った。実施例6で得た組換え大腸菌HB101(pNTAX)、HB101(pNTAXG)、HB101(pNTAX, pSTVG)、及びベクタープラスミドのみの形質転換体である組換え大腸菌HB101(pUCNT)のそれぞれを同培地に植菌後、37°Cで18時間振とう培養した。但し、HB101(pNTAX)、HB101(pNTAXG)、HB101(pUCNT)の培養時には120μg/mlとなるようにアンピシリンを加え、

またHB101(pNTAX, pSTVG)の培養時にはそれぞれ120 μg/ml, 50 μg/mlとなるようにアンピシリン、クロラムフェニコールを加えた。集菌後、10mMリン酸緩衝液(pH7)に懸濁し、超音波破碎を行うことにより無細胞抽出液を得た。各組換え大腸菌の無細胞抽出液について、3-ケトペンタンニトリル還元比活性及びGDH比活性を測定した。GDH比活性の測定は、1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.0)に、基質グルコース0.1M、補酵素NADP<sup>+</sup>2mM及び酵素を添加し、25°Cで波長340mMの吸光度の増加を測定することにより行った。この反応条件において、1分間に1 μmolのNADP<sup>+</sup>をNADPHに還元する酵素活性を1unitと定義した。結果を表2に示す。

[0106] [表2]

菌株名	3-ケトペンタンニトリル 還元比活性 (units/mg)	GDH比活性 (units/mg)
HB101(pUCNT)	<0.1	<0.01
HB101(pNTAX)	9.3	<0.01
HB101(pNTAXG)	4.3	195
HB101(pNTAX, pSTVG)	7.0	10

[0107] 組換え大腸菌HB101(pNTAX)では、ベクタープラスミドのみの形質転換体である組換え大腸菌HB101(pUCNT)と比較して、明らかな3-ケトペンタンニトリル還元比活性の増加がみられた。また、組換え大腸菌HB101(pNTAXG)及び組換え大腸菌HB101(pNTAX, pSTVG)では、ベクタープラスミドのみの形質転換体である組換え大腸菌HB101(pUCNT)と比較して、明らかな3-ケトペンタンニトリル還元比活性及びGDH比活性の増加がみられた。

[0108] (実施例8)組換え大腸菌HB101(pNTAX)を用いた3-ケトペンタンニトリルからの(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルの合成

組換え大腸菌HB101(pNTAX)を実施例7と同様に培養、菌体破碎を行い、無細胞抽出液を調製した。あらかじめ3-ケトペンタンニトリル5mg、NADPH50mg及び1Mリン酸緩衝液(pH6.5)50 μlを入れた試験管に、先の無細胞抽出液450 μlを加えて、30°Cで一晩振とうした。酢酸エチル1mlで2回抽出を行い、生成物である3-ヒドロキシペンタンニトリルの生成量と光学純度を測定したところ、生成量3.7mg、光学純度(R)99.2%e.e.であった。

[0109] (実施例9)組換え大腸菌HB101(pNTAXG)を用いた3-ケトペンタンニトリルから

の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルの合成

組換え大腸菌HB101(pNTAXG)を実施例7と同様に培養後、菌体破碎を行い、無細胞抽出液を調製した。無細胞抽出液450 μlに1Mリン酸緩衝液(pH6.5)50 μl、グルコース13.9mg、NADP<sup>+</sup>1mg、3-ケトペンタンニトリル5mgを添加し、30°Cで一晩攪拌した。反応後、生成物である3-ヒドロキシペンタンニトリルの生成量と光学純度を測定したところ、生成量4.5mg、光学純度99.2%e. e.であった。

[0110] (実施例10)組換え大腸菌HB101(pNTAX, pSTVG)を用いた3-ケトペンタンニトリルからの(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルの合成

組換え大腸菌HB101(pNTAX, pSTVG)を実施例7と同様に培養した。得られた培養液20mlにグルコース5.0g、NADP<sup>+</sup>3mg、3-ケトペンタンニトリルのナトリウム塩0.2gを添加し、5Nの水酸化ナトリウム水溶液を滴下することによりpH6.5に調整しながら、30°Cで攪拌した。反応後1.5時間目、3時間目、4.8時間目、5.7時間目、7時間目、及び9時間目に各0.2gの3-ケトペンタンニトリルのナトリウム塩をそれぞれ添加した。また反応9.4時間目に培養液4mlとNADP<sup>+</sup>3mgを加えた。反応後24時間目に生成物である3-ヒドロキシペンタンニトリルの生成量と光学純度を測定したところ、生成量1.1g、光学純度99.2%e. e.であった。

[0111] (実施例11)組換え大腸菌HB101(pNTAX, pSTVG)を用いた3-ケトペンタンニトリルからの(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルの合成

組換え大腸菌HB101(pNTAX, pSTVG)を実施例7と同様に培養した。1Lのセパラブルフラスコに、得られた培養液400ml、グルコース36.3g、NADP<sup>+</sup>50mg、3-ケトペンタンニトリルのナトリウム塩3.5gを入れ、pHを6.5に調整後、30°Cで攪拌した。3-ケトペンタンニトリルのナトリウム塩18.5gをイオン交換水37mlに溶解した3-ケトペンタンニトリル水溶液を別に調製し、この溶液を加えることにより反応液のpHを6.5に保った。3-ケトペンタンニトリル水溶液を全量添加した後は、30%水酸化ナトリウム水溶液を添加して反応液をpH6.5に保った。反応終了後、反応液を酢酸エチルで抽出し、水相を更に酢酸エチルで抽出した。有機相を合わせて減圧下で溶媒を留去後、蒸留により精製を行った。そして、光学純度99.2%e. e.の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリル13.5gを取得した。

[0112] (実施例12)ラルストニア・ユートロファ ATCC17699株由来アセトアセチルCoA還元酵素をコードする遺伝子を含む組換えベクターの作製

ラルストニア・ユートロファ (Ralstonia eutropha) 由来のアセトアセチルCoA還元酵素(以後RREと記す)を大腸菌で発現させるために、形質転換に用いる組換えベクターを作製した。RRE遺伝子を取得するにあたり、J. Biol. Chem., 264, 15293 (1989)で報告されているRRE遺伝子の塩基配列情報を参考にした。まず、RRE遺伝子の開始コドン部分にNdeI部位を付加し、かつ終始コドンの直後に新たな終始コドンとEcoRI部位を付加した二本鎖DNAを以下 の方法により取得した。

[0113] RREの構造遺伝子の開始コドン部分にNdeI部位を付加したプライマー9(5'-AAG GAGTGCATATGACTCAGCGCATTGCGTATGTG-3':配列番号13)、及び終始コドンの直後に新たな終始コドンとEcoRI部位を付加し、更にNdeI部位を破壊するために一塩基置換したプライマー10(5'-GTAGAATTCTTATCAGCCC ATGTGCAGGCCGCG-3':配列番号14)を合成した。プライマー2種(プライマー9及びプライマー10)各100pmol、ラルストニア・ユートロファ ATCC17699株の染色体DNA132ng、dNTP各20nmol、ExTaq(宝酒造社製)2.5Uを含むExTaq用緩衝液100μlを調製し、熱変性(97°C、0.5分)、アニーリング(65°C、1分)、伸長反応(72°C、1分)を30サイクル行い、4°Cまで冷却後、アガロースゲル電気泳動により増幅DNAを確認した。PCRに使用したラルストニア・ユートロファ ATCC17699株の染色体DNAの調製は、実施例3で記載したアクロモバクター・キシロソキシダンス・サブスピー・デニトリフィカанс IFO15125株の染色体DNAの調製と同様に行った。

上記増幅断片をNdeI及びEcoRIで消化し、プラスミドpUCNT(WO94/03613)のlacプロモーター下流のNdeI-EcoRI部位に挿入することにより、組換えベクターpNTREを得た。pNTREの作製法及び構造を図3に示す。

[0114] (実施例13)RREを生産する組換え大腸菌の作製

実施例12で得た組換えベクターpNTREを用いて大腸菌HB101(宝酒造社製)を形質転換し、組換え大腸菌HB101(pNTRE)を得た。こうして得られた形質転換体である組換え大腸菌HB101(pNTRE)(受託番号FERM P-19566、寄託日平成

15年10月23日)は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。

また、実施例6で得られた組換えベクターpSTVGで、予め塩化カルシウム法でコンピテント化しておいた組換え大腸菌HB101(pNTRE)を形質転換し、組換え大腸菌HB101(pNTRE, pSTVG)を得た。こうして得られた形質転換体である組換え大腸菌HB101(pNTRE, pSTVG)(受託番号FERM BP-10125、原寄託日平成15年10月23日の国内寄託をブダペスト条約に基づく国際寄託に移管)は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。

[0115] (実施例14)組換え大腸菌におけるRRE及びGDHの発現

実施例13で得た組換え大腸菌HB101(pNTRE)、HB101(pNTRE, pSTVG)、及びベクタープラスミドのみの形質転換体である組換え大腸菌HB101(pUCNT)を実施例7と同様に培養後、無細胞抽出液を調製した。各組換え大腸菌の無細胞抽出液について、3-ケトペンタンニトリル還元比活性及びGDH比活性を測定した。結果を表3に示す。

[0116] [表3]

菌株名	3-ケトペンタンニトリル 還元比活性 (units/mg)	GDH比活性 (units/mg)
HB101(pUCNT)	<0. 1	<0. 01
HB101(pNTRE)	3. 6	<0. 01
HB101(pNTRE, pSTVG)	2. 9	19

[0117] 組換え大腸菌HB101(pNTRE)では、ベクタープラスミドのみの形質転換体である組換え大腸菌HB101(pUCNT)と比較して、明らかな3-ケトペンタンニトリル還元比活性の増加がみられた。また、組換え大腸菌HB101(pNTRE, pSTVG)では、ベクタープラスミドのみの形質転換体である組換え大腸菌HB101(pUCNT)と比較して、明らかな3-ケトペンタンニトリル還元比活性及びGDH比活性の増加がみられた。

[0118] (実施例15)組換え大腸菌HB101(pNTRE)を用いた3-ケトペンタンニトリルからの(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルの合成

組換え大腸菌HB101(pNTRE)を実施例7と同様に培養、菌体破碎を行い、無細

胞抽出液を調製した。あらかじめ3-ケトペンタンニトリル5. 0mg、NADPH50mg及び1Mリン酸緩衝液(pH6. 5)50  $\mu$ lを入れた試験管に、先の無細胞抽出液450  $\mu$ lを加えて、30°Cで一晩振とうした。酢酸エチル1mlで2回抽出を行い、生成物である3-ヒドロキシペンタンニトリルの生成量と光学純度を測定したところ、生成量2. 5mg、光学純度(R)98. 4%e. e. であった。

[0119] (実施例16)組換え大腸菌HB101(pNTRE, pSTVG)を用いた3-ケトペンタンニトリルからの(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルの合成

組換え大腸菌HB101(pNTRE, pSTVG)を実施例7と同様に培養し、培養液を取得した。培養液20mlにグルコース5. 0g、NADP<sup>+</sup>3mg、3-ケトペンタンニトリルのナトリウム塩0. 2gを添加し、5Nの水酸化ナトリウム水溶液を滴下することによりpH6. 5に調整しながら、30°Cで攪拌した。反応後2時間目、3時間目、5時間目、7時間目、8時間目、及び9時間目に各0. 2gの3-ケトペンタンニトリルのナトリウム塩をそれぞれ添加した。また反応10時間目に培養液4mlとNADP<sup>+</sup>3mgを加えた。反応後24時間目に生成物である3-ヒドロキシペンタンニトリルの生成量と光学純度を測定したところ、生成量1. 0g、光学純度98. 3%e. e. であった。

[0120] (実施例17)組換え大腸菌HB101(pNTAX, pSTVG)を用いたアセト酢酸メチルからの(R)-3-ヒドロキシブタン酸メチルの合成

組換え大腸菌HB101(pNTAX, pSTVG)を実施例7と同様に培養した。得られた培養液20mlにグルコース5. 0g、NADP<sup>+</sup>3mg、アセト酢酸メチル0. 4gを添加し、5Nの水酸化ナトリウム水溶液を滴下することによりpH6. 5に調整しながら、30°Cで攪拌した。反応後1. 5時間目、3時間目、4. 5時間目、5. 5時間目、7時間目に各0. 4gのアセト酢酸メチルをそれぞれ添加した。反応後24時間目に生成物である3-ヒドロキシブタン酸メチルの生成量をキャピラリーガスクロマトグラフィーで分析した。

[分析条件]

カラム:TC-WAX(15m × 0. 25mm)(GLサイエンス社製)、検出:FID、カラム温度:85°C、注入温度:200°C、検出温度:200°C、キャリアーガス:ヘリウム(70kPa)、スプリット比:100/1、溶出時間:アセト酢酸メチル 2. 9分、3-ヒドロキシブタン酸メチル 3. 8分。

[0121] また、生成した3-ヒドロキシブタン酸メチルの光学純度は、ジニトロベンゾイル化後、HPLC分析することにより測定した。3-ヒドロキシブタン酸メチルのジニトロベンゾイル化は、反応液から3-ヒドロキシブタン酸メチルを酢酸エチルで抽出後、ピリジン及び3, 5-ジニトロ塩化ベンゾイルを3-ヒドロキシブタン酸メチルの1. 2当量添加後、室温で2時間攪拌することにより行った。1規定塩酸で洗浄後、分取用薄層クロマトグラフィーにより精製取得し、これをエタノールに溶解後、下記HPLC条件で分析した。

[分析条件]

カラム:Chiralpak AD-H(ダイセル化学社製)、検出波長:230nm、カラム温度:20°C、溶出液:n-ヘキサン／エタノール=3/7、流速:0. 7ml/min、溶出時間:S体 21. 7分、R体 29. 8分。

その結果、3-ヒドロキシブタン酸メチルの生成量は1. 9g、光学純度97. 2%e. e. であった。

[0122] (実施例18)組換え大腸菌HB101(pNTRE, pSTVG)を用いたアセト酢酸メチルからの(R)-3-ヒドロキシブタン酸メチルの合成

組換え大腸菌HB101(pNTAX, pSTVG)のかわりに組換え大腸菌HB101(pNTRE, pSTVG)を用いた以外は、実施例17と同様に反応を行い、反応後24時間目に生成した3-ヒドロキシブタン酸メチルの生成量と光学純度を測定した。その結果、3-ヒドロキシブタン酸メチルの生成量は1. 9g、光学純度98. 3%e. e. であった。

[0123] (実施例19)組換え大腸菌HB101(pNTAX, pSTVG)を用いた2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノンからの(R)-2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールの合成

組換え大腸菌HB101(pNTAX, pSTVG)を実施例7と同様に培養した。得られた培養液20mlにグルコース5. 0g、NADP<sup>+</sup>3mg、2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノン0. 4gを添加し、5Nの水酸化ナトリウム水溶液を滴下することによりpH6. 5に調整しながら、30°Cで攪拌した。反応後2時間目、4時間目、6時間目、8時間目に各0. 4gの2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノンをそれぞれ添加した。反応後24時間目に生成物である2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールの生成量及

び光学純度を下記条件で分析して求めた。

[0124] [分析条件]

カラム:Chiralpak OJ(ダイセル化学社製)、検出波長:210nm、カラム温度:20°C、溶出液:n-ヘキサン／イソプロパノール=39／1、流速:1. 0ml／min、溶出時間:2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノン 25. 3分、(R)-2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノール 38. 4分、(S)-2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノール 44. 0分。

その結果、2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールの生成量は1. 9g、光学純度99. 0%e. e. であった。

[0125] (実施例20)組換え大腸菌HB101(pNTRE, pSTVG)を用いた2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノンからの(R)-2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールの合成

組換え大腸菌HB101(pNTAX, pSTVG)のかわりに組換え大腸菌HB101(pNTRE, pSTVG)を用いた以外は、実施例19と同様に反応を行い、反応後24時間目に生成した2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールの生成量と光学純度を測定した。その結果、2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノールの生成量は1. 9g、光学純度99. 9%e. e. であった。

### 産業上の利用可能性

[0126] 本発明によれば、高光学純度の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリル、(R)-3-ヒドロキシブタン酸エステル、光学活性1-フェニルエタノール誘導体といった有用な光学活性アルコールを簡便な方法で製造することができる。とりわけ、(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルに関しては、95%e. e. 以上、本発明の新規アセトアセチルCoA還元酵素を用いれば99%e. e. 以上の、従来にない極めて高い光学純度の製品を得ることが可能である。

### 図面の簡単な説明

[0127] [図1]RAXをコードする遺伝子の塩基配列及びRAXの推定アミノ酸配列。

[図2]組換えベクターpNTAX、pNTAXG、pSTVGの構築。

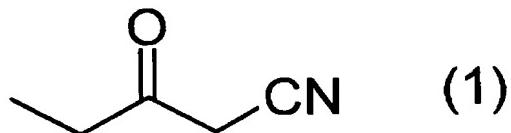
[図3]組換えベクターpNTREの構築。

## 請求の範囲

[1] 以下の(1)及び(2)の理化学的性質を有するアセトアセチルCoA還元酵素:

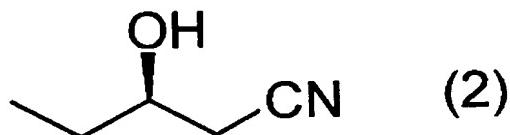
(1)作用:NADPHもしくはNADHを補酵素として、下記式(1):

[化1]



で表される3-ケトペンタンニトリルに作用して、下記式(2):

[化2]



で表される光学純度99%e. e. 以上の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルを生成する

、

(2)分子量:ゲル滻過分析において約85500、SDSポリアクリルアミド電気泳動分析において約26000。

[2] 更に、以下の(3)～(5)の理化学的性質を有する請求項1記載のアセトアセチルCoA還元酵素:

(3)至適温度:27～33℃、

(4)至適pH:5. 5～6. 5、

(5)阻害剤:p-クロロメルクリ安息香酸、硫酸銅、硝酸銀、塩化水銀で阻害される。

[3] 下記(a)又は(b)のいずれかに記載のポリペプチドであるアセトアセチルCoA還元酵素:

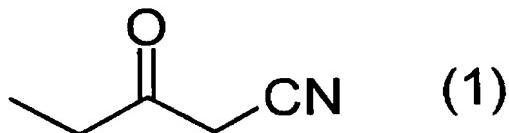
(a)配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(b)配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸が付加、欠失又は置換したアミノ酸配列からなり、3-ケトペンタンニトリルに作用して、光学純度99%e. e. 以上の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルを生成する活性を有す

るポリペプチド。

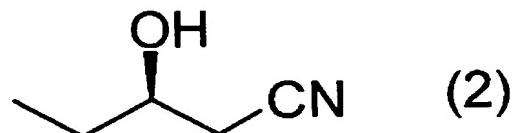
- [4] アクロモバクター (Achromobacter) 属に属する微生物由来である請求項1～3のいずれか1項に記載のアセトアセチルCoA還元酵素。
- [5] アクロモバクター・キシロソキシダンス・サブスピー・デニトリフィカンス (Achromobacter xylosoxidans subsp. denitrificans) に属する微生物由来である請求項1～3のいずれか1項に記載のアセトアセチルCoA還元酵素。
- [6] アクロモバクター・キシロソキシダンス・サブスピー・デニトリフィカンス (Achromobacter xylosoxidans subsp. denitrificans) IFO15125株由来である請求項1～3のいずれか1項に記載のアセトアセチルCoA還元酵素。
- [7] 請求項1～6のいずれか1項に記載のアセトアセチルCoA還元酵素をコードするDNA。
- [8] 配列表の配列番号2で示される塩基配列からなるDNA。
- [9] 請求項7又は8に記載のDNAを含有する組換えベクター。
- [10] 図2においてpNTAXで示される請求項9記載の組換えベクター。
- [11] グルコース脱水素酵素をコードするDNAを更に含有する請求項10記載の組換えベクター。
- [12] 前記グルコース脱水素酵素がバシラス・メガテリウム (Bacillus megaterium) 由来のものである請求項11記載の組換えベクター。
- [13] 請求項9～12のいずれか1項に記載の組換えベクターを用いて宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。
- [14] 請求項7又は8に記載のDNAを含有する第1の組換えベクター、及びグルコース脱水素酵素をコードするDNAを含有する第2の組換えベクターを用いて宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。
- [15] 第1の組換えベクターが前記pNTAXであり、前記グルコース脱水素酵素がバシラス・メガテリウム (Bacillus megaterium) 由来のものである請求項14記載の形質転換体。
- [16] 第1の組換えベクターが前記pNTAXであり、第2の組換えベクターが図2においてpSTVGで示される組換えベクターである請求項14記載の形質転換体。

- [17] 宿主細胞が大腸菌である請求項13～16のいずれか1項に記載の形質転換体。
- [18] E. coli HB101(pNTAX) (FERM BP-10126) である請求項17に記載の形質転換体。
- [19] E. coli HB101(pNTAX, pSTVG) (FERM P-19567) である請求項17に記載の形質転換体。
- [20] 下記式(1)：  
[化3]



で表される3-ケトヘプタンニトリルに、アセトアセチルCoA還元酵素を作用させることを特徴とする、下記式(2)

[化4]



で表される(R)-3-ヒドロキシヘプタンニトリルの製造方法。

- [21] 生成する(R)-3-ヒドロキシヘプタンニトリルの光学純度が95%e. e. 以上である請求項20に記載の製造方法。
- [22] 下記式(3)：  
[化5]



(式中、Rは置換されていても良く、分岐していても良い低級アルキル基を示す)で表されるアセト酢酸エステルに、アセトアセチルCoA還元酵素を作用させることを特徴と

する、下記式(4)

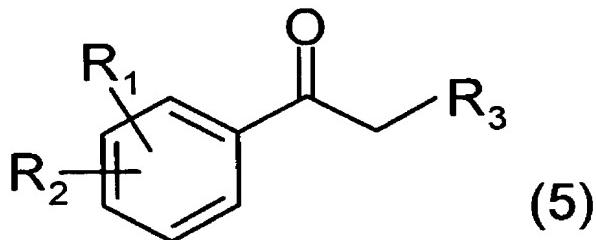
[化6]



(式中、Rは前記と同じ)で表される(R)-3-ヒドロキシブタン酸エスチルの製造方法。

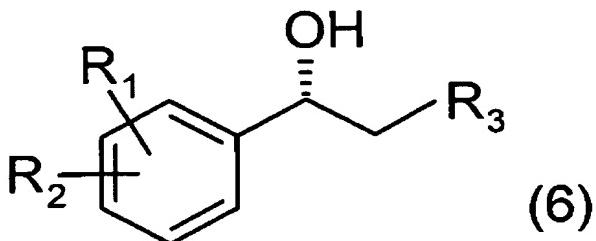
[23] 下記式(5)：

[化7]



(式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>は水素原子、ハロゲン原子、アルコキシ基、又はニトロ基を示し、それぞれ同一でも異なっていてもよい。またR<sub>3</sub>は水素原子、ハロゲン原子、水酸基、又は置換されていてもよいアルキル基を示す)で表される1-フェニルエタノン誘導体に、アセトアセチルCoA還元酵素を作用させることを特徴とする、下記式(6)

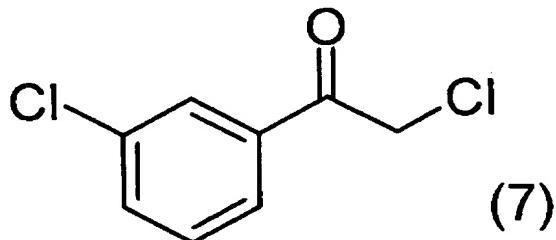
[化8]



(式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>は前記と同じ)で表される光学活性1-フェニルエタノール誘導体の製造方法。

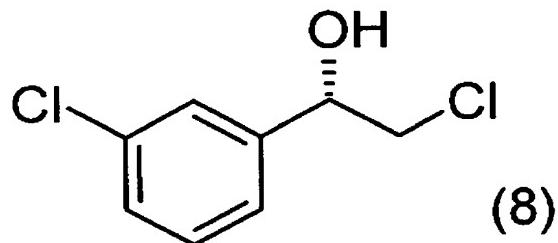
[24] 下記式(7)：

[化9]



で表される2—クロロ—1—(3'—クロロフェニル)エタノンに、アセトアセチルCoA還元酵素を作用させて、下記式(8)

[化10]



で表される(R)—2—クロロ—1—(3'—クロロフェニル)エタノールを製造する、請求項23記載の製造方法。

- [25] アクロモバクター(*Achromobacter*)、アシネトバクター(*Acinetobacter*)、ラルストニア(*Ralstonia*)、アルカリゲネス(*Alcaligenes*)、アゾスピリラム(*Azospirillum*)、アゾトバクター(*Azotobacter*)、バチルス(*Bacillus*)、クロマチウム(*Chromatium*)、エクトチオロドスピラ(*Ectothiorhodospira*)、ルピナス(*Lupinus*)、メチロバクテリウム(*Methylobacterium*)、パラコッカス(*Paracoccus*)、リゾビウム(*Rhizobium*)、ロドコッカス(*Rhodococcus*)、シネココッカス(*Synechococcus*)、シントロフォモナス(*Syntrophomonas*)、チオカプサ(*Thiocapsa*)、又はズーグロエア(*Zoogloea*)に属する微生物由来のアセトアセチルCoA還元酵素を用いる請求項20—24のいずれか1項に記載の製造方法。
- [26] 請求項1—6のいずれか1項に記載のアセトアセチルCoA還元酵素を用いる請求項20—24のいずれか1項に記載の製造方法。
- [27] アセトアセチルCoA還元酵素として、請求項13—19のいずれか1項に記載の形質転換体の培養物を用いる請求項20—24のいずれか1項に記載の製造方法。

- [28] アセトアセチルCoA還元酵素として下記(c)～(e)のいずれかに記載のポリペプチドを用いる請求項20～24のいずれか1項に記載の製造方法：
- (c)配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- (d)配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が付加、欠失又は置換したアミノ酸配列からなり、3-ケトペンタンニトリルを不斉還元し、光学純度95%e. e. 以上の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルを生成する活性を有するポリペプチド、
- (e)配列表の配列番号4に記載の塩基配列と相補する塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするポリペプチドであって、3-ケトペンタンニトリルを不斉還元し、光学純度95%e. e. 以上の(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリルを生成する活性を有するポリペプチド。
- [29] アセトアセチルCoA還元酵素がラルストニア (*Ralstonia*) 属に属する微生物由来である、請求項28に記載の製造方法。
- [30] アセトアセチルCoA還元酵素がラルストニア・ユートロファ (*Ralstonia eutropha*) に属する微生物由来である、請求項28に記載の製造方法。
- [31] 請求項28～30のいずれか1項に記載の製造方法で用いたアセトアセチルCoA還元酵素に加え、更にグルコース脱水素酵素を発現させた形質転換体を用いる、請求項20～25のいずれか1項に記載の製造方法。
- [32] 配列表の配列番号4で示される塩基配列からなるDNAを含有し、図3においてpNTREとして示される組換えベクター。
- [33] 組換え大腸菌E. coli HB101(pNTRE) (FERM P-19566) である形質転換体。
- [34] 組換え大腸菌E. coli HB101(pNTRE, pSTVG) (FERM BP-10125) である形質転換体。
- [35] アセトアセチルCoA還元酵素として、請求項33又は34に記載の形質転換体の培養物を使用することを特徴とする、請求項20～24のいずれか1項に記載の製造方法。

[図1]

1 TCAATCACGAGGCGTCCGTGCACACAGGAGGAATCCAATGAGCGGAAACTGGCTTA 60  
   M S G K L A Y

61 CGTTACAGGCCGGATGGCGGTATCGGCACCTCAATTGCCAGCGCCTGGCAAAGATGG 120  
   V T G G M G G I G T S I C Q R L A K D G

121 CTTTCGCGTGGTGGCAGGCTGCAGCCCCAGCCGCAATTACCAAGCAATGGCTGGATGAACA 180  
   F R V V A G C G P S R N Y Q Q W L D E Q

181 GGCGGCCCAGGGCTATACGTTTACCGCGTCAGTGGGCAACGTGTCCGATTGGGAGTCCAC 240  
   A A Q G Y T F Y A S V G N V S D W E S T

241 GGTAGAACGATTCGAGCGCGTCAGCGGGACATGGGCCCGTCGATGTGCTGGTCAACAA 300  
   V E A F E R V K R D M G P V D V L V N N

301 CGCGGGCATACCCCGCGACGGCCTGTTCCGCAAGATGAGCGCCGACGACTGGCGCGCGT 360  
   A G I T R D G L F R K M S A D D W R A V

361 CATCGACACCAACCTGAACAGCCTCTTCAACGTGACCAAGCAGGTGATCGACGACATGGT 420  
   I D T N L N S L F N V T K Q V I D D M V

421 CGAGCGCCAGTGGGCGCATCGTCAACATCAGCTGGTGAACGGGAGAAGGGCAGTT 480  
   E R Q W G R I V N I S S V N G Q K G Q F

481 CGGCCAGACGAACTATTCCACGGCGAAGGCGGGCATCCATGGCTTACCATGGCGCTGGC 540  
   G Q T N Y S T A K A G I H G F T M A L A

541 GCAGGAAGTGGCCAGCAAGGGCATCACGGTCAACACGGTGTGCCGGCTACATGGCAC 600  
   Q E V A S K G I T V N T V S P G Y I G T

601 GGACATGGTTCCGCGCCATCCGTCCGGACGTGCTGGAAAAGATCGTCGCCACCATTCCGGT 660  
   D M V R A I R P D V L E K I V A T I P V

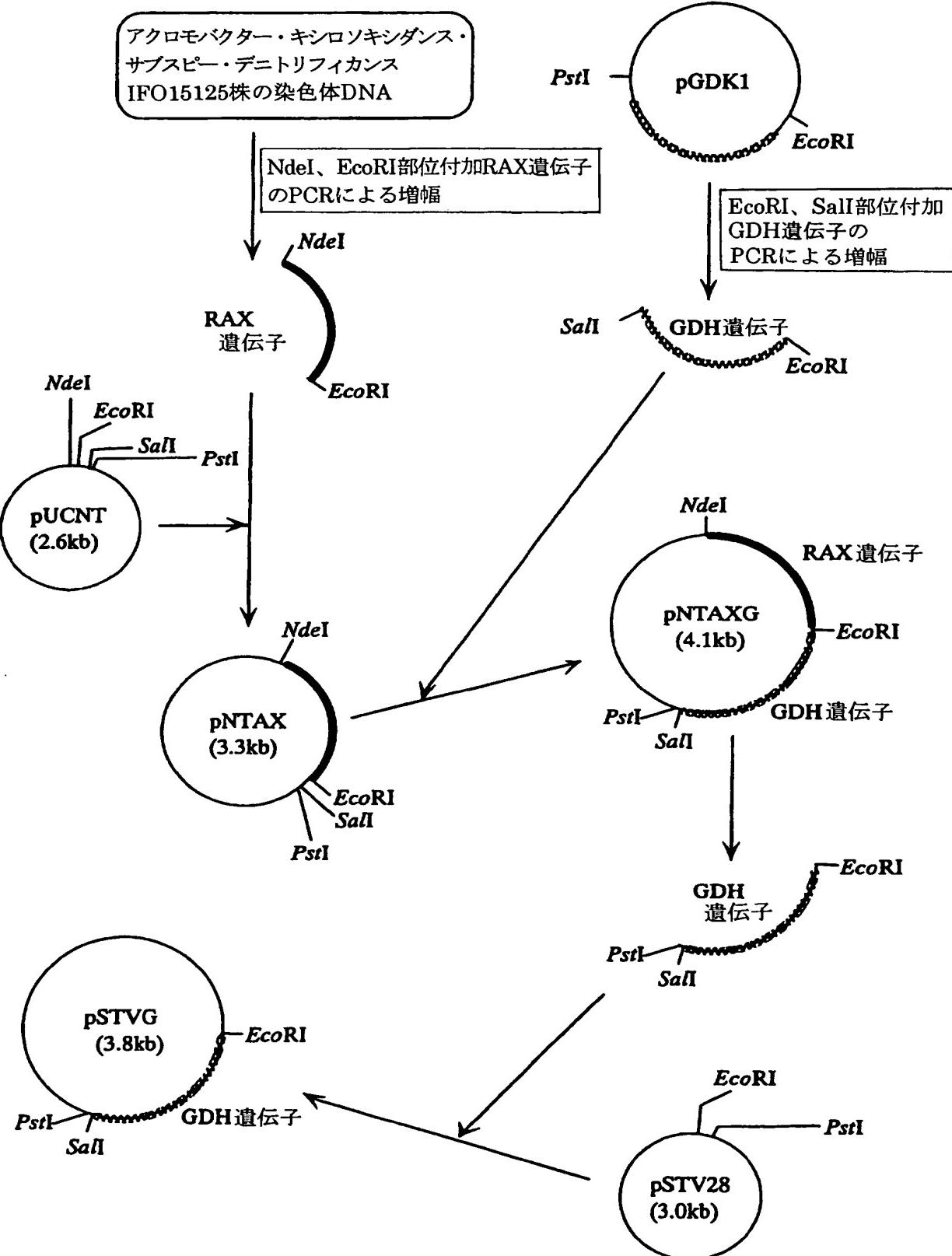
661 GCGCCGCTGGGACGCCGGAGGAAATCGCGTCCATCACGTGCTGGCTGCCCTCGGATGA 720  
   R R L G T P E E I A S I T S W L A S D E

721 GTCTGGGTTTCGACGGCGCGGACTTCTCGCTAACGGCGGCTGCATATGGGCTGAAG 780  
   S G F S T G A D F S L N G G L H M G \*

781 CATCGCGGGCCGCCACGAGCGGCCGCCGGCGCCGGCCTCGGGAGAGGGCCGTCC 840

841 GGCATTACACTTACCCTTATCCGAAGTCTTAGAGATCGCCCGATCCGGGGACAACCATGA 900

[図2]



[図3]

